
**БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

УДК 543.94, 577.151.03

**СТАБИЛИЗАЦИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МЕТОДОМ
ВКЛЮЧЕНИЯ В ГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ**

© 2018 г. В. И. Лоншакова-Мукина¹, Е. Н. Есимбекова^{1,2,*}, В. А. Кратасюк^{1,2}

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном 04.09.2017 г.

Поступило 25.09.2017 г.

Предложен новый метод получения стабильных препаратов бутирилхолинэстеразы (BuChE), основанный на иммобилизации фермента в крахмальный и желатиновый гели с последующим высушиванием. Совместная иммобилизация BuChE с индикатором тиоловых групп – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой – не снизило активность BuChE, что позволило нам упростить процедуру и сократить время анализа фосфорорганических пестицидов. Полученные иммобилизованные препараты сохраняли активность в течение не менее 300 сут. Препараты BuChE на основе крахмального геля обладали большей чувствительностью при определении пестицидов по сравнению с препаратами на основе желатинового геля.

DOI: 10.7868/Σ0869565218100237

Высокая чувствительность и селективность методов определения веществ с помощью ферментов обуславливает широкое использование последних в качестве аналитических систем для экспресс-анализа степени загрязнённости экосистем разной сложности [1–3]. Тем не менее практическое использование ферментных методов контроля объектов окружающей среды на сегодняшний день остаётся весьма ограниченным. И связано это не столько с отсутствием нормативной базы их применения, сколько с проблемой обеспечения стабильности препаратов ферментов, а именно, сохранение величины аналитического сигнала при повышенных температурах, экстремальных значениях pH и т.д. [4]. Для более широкого использования ферментов в методах экологического биотестирования, оценки качества воды, воздуха и почвы необходимо получение реагентов, сочетающих стабильность при хранении и использовании с чувствительностью при взаимодействии с веществами-ингибиторами ферментов на уровне предельно допустимых концентраций.

Среди ингибиторов ферментов, имеющих значение при аналитическом контроле объектов окру-

жающей среды, особое место занимают фосфорорганические пестициды. Использование их в больших объёмах привело к существенному загрязнению ряда экосистем этими веществами. Токсичность большинства из них для теплокровных животных и поддержание довольно высоких концентраций пестицидов в окружающей среде создают потенциальную опасность для человека и требуют развития экспресс-методов контроля их содержания. Так, бутирилхолинэстераза (BuChE) – фермент из класса гидролаз – наряду с ацетилхолинэстеразой активно используется в ингибиторном анализе, в том числе фосфорорганических пестицидов [5]. В основе анализа – изменение активности BuChE в присутствии пестицидов, пропорциональное их содержанию в анализируемом образце. Наиболее распространённым методом определения активности BuChE в присутствии пестицидов, является метод Элмана [6]. Бутирилхолинэстераза гидролизует субстрат бутирилтиохолин до тиохолина и масляной кислоты. Тиохолин взаимодействует с 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана) с образованием окрашенной в жёлтый цвет 2-нитро-5-тиобензойной кислоты, скорость образования которой прямо пропорциональна активности фермента.

Наиболее распространённым способом сохранения активности, а значит, увеличения стабильности BuChE является её иммобилизация на разного рода носителях. На сегодняшний день известно более 40 способов иммобилизации BuChE [7].

¹Сибирский федеральный университет, Красноярск

²Институт биофизики Сибирского отделения Российской Академии наук Федерального исследовательского центра “Красноярский научный центр СО РАН”, Красноярск

*E-mail: esimbekova@yandex.ru

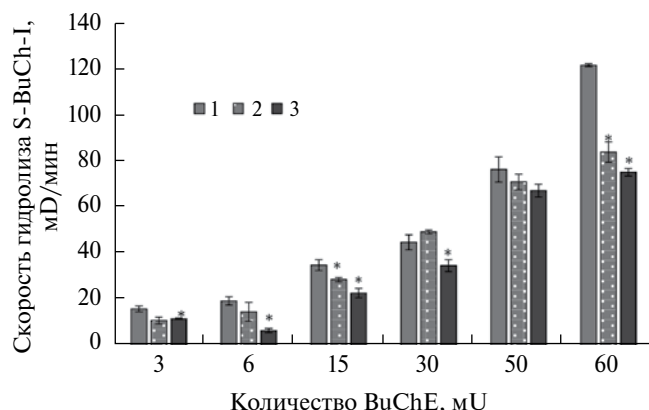


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза S-BuChE-I от количества BuChE в препарате. 1 – растворимая BuChE, 2 – BuChE, иммобилизованная в желатиновый гель совместно с 0,2 мМ реактива Элмана, 3 – BuChE, иммобилизованная в крахмальный гель совместно с 0,2 мМ реактива Элмана. $M \pm m$, $n = 5$, $*p < 0,05$ по сравнению со скоростью гидролиза S-BuChE-I растворимой BuChE.

В большинстве случаев используют кросс-сшивку фермента глутаровым альдегидом в присутствии инертного белка [8]. В последнее время приобретают популярность методы включения BuChE в поверхностные организованные слои (плёнки Ленгмюра–Блоджетт) [9] и физическая адсорбция фермента в агарозный гель с добавлением кремниевых наночастиц [10]. При использовании последних двух способов иммобилизации сохраняется доступность фермента для взаимодействия с ингибитором. Однако все эти методы исключают возможность совместной иммобилизации BuChE с другими компонентами аналитической системы определения активности BuChE, что усложняет процедуру эксперимента. Этого недостатка лишены методы включения фермента в полисилоксановый, винилпирролидоновый и крахмальный гели [11, 12].

Цель нашей работы – получение многокомпонентных, стабильных при хранении и использовании препаратов BuChE. Для реализации данной цели мы провели совместную иммобилизацию BuChE с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой в желатиновый и крахмальный гели с последующим высушиванием.

В работе использовали лиофилизированную BuChE из лошадиной сыворотки (“Sigma-Aldrich”, США). Активность BuChE – 15003 нкат/мг. В качестве субстрата использовали йодид S-бутирилтиохолина, в качестве индикатора тиоловых групп – реактив Элмана (“Sigma-Aldrich”). Активность

BuChE определяли как скорость гидролиза субстрата S-бутирилтиохолина йодида (мД/мин, миллиединицы оптической плотности в минуту) в калий-фосфатном буфере (0,05 М, pH 7,9), содержащем 4 мМ реактива Элмана. В реакции образуется окрашенный в жёлтый цвет анион, регистрацию которого проводят спектрофотометрическим методом при длине волны 412 нм [6]. Иммобилизацию ферментов и реактива Элмана в крахмальный и желатиновый гели проводили способами, описанными в [13]. Препарат представлял собой высушенный диск диаметром 6–7 мм (сухой вес $1,5 \pm 0,2$ мг). Каждая экспериментальная точка – результат не менее трёх измерений. При статистической обработке полученных результатов использовали критерий t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

В работе провели сравнение активности BuChE, используемой в растворимой форме и иммобилизованной совместно с реактивом Элмана в крахмальный и желатиновый гели. Из рис. 1 видно, что при использовании в качестве носителя для иммобилизации желатинового и крахмального гелей существенной потери активности BuChE при совместной иммобилизации с 0,2 мМ реактива Элмана не происходило. Следовательно, для обеспечения высокого выхода активности иммобилизованного ферментного препарата можно использовать оба варианта гелей.

Помимо высокой активности важной характеристикой ферментного препарата является его стабильность при хранении. Мы обнаружили, что полученные препараты на основе BuChE, иммобилизованной совместно с реактивом Элмана, отличаются длительным сроком хранения без потери активности. Например, активность препаратов, содержащих 1,83 нкат BuChE и 0,2 мМ индикатора, не изменилась в процессе хранения при 4 °C в течение 300 сут (рис. 2). Подобный стабилизирующий эффект объясняется пространственными ограничениями, возникающими при включении фермента в гели и препятствующими изменению нативной структуры белковой глобулы фермента.

Иммобилизованные ферментные препараты способны проявлять активность при использовании вместо буфера дистиллированной воды (рис. 2). Несмотря на то, что активность препаратов в дистиллированной воде снижается в 2 или 3 раза (в зависимости от природы используемого геля), для дальнейшего применения этих препаратов в биотестировании факт сохранения активности в дистиллированной воде является весьма важным. Он означает, что данные препараты можно использовать для проведения анализа проб клас-

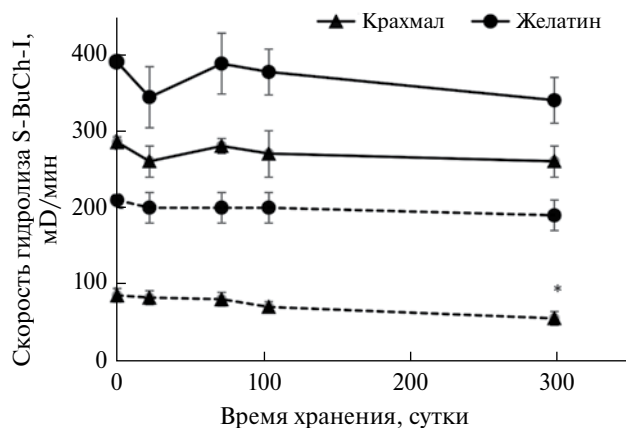


Рис. 2. Зависимость скорости гидролиза S-BuCh-I в буферном растворе (сплошная линия) и в дистиллированной воде (пунктирная линия) от времени хранения. $M \pm m$, $n = 5$, $*p < 0,05$ по сравнению со скоростью гидролиза S-BuCh-I в начальный момент времени.

сическим способом тестирования, т.е. проверяя уровень безопасного разведения пробы.

Стоит отметить, что препараты, полученные на основе желатинового геля, обладали более высокой активностью и в большей степени сохраняли свою активность при хранении по сравнению с препаратами, полученными на основе крахмального геля. Мы установили, что у препарата на основе желатинового геля, содержащего 1,8337 нкат BuChE и 0,2 мМ индикатора, скорость гидролиза S-BuCh-I на 30% была выше по сравнению с реагентами на основе крахмального геля (рис. 2). Эти различия могут быть обусловлены разными механизмами стабилизации фермента в полисахаридном и полипептидном гелях.

Далее на примере малатиона и пиримифосметила мы оценили чувствительность BuChE, иммобилизованной совместно с реагентом Элмана, к ингибирующему действию фосфорорганических соединений (ФОС). Исследовали зависимость «доза–эффект», на основании которой определили значения параметров IC_{20} и IC_{50} , представляющих собой эффективные концентрации ингибирующего вещества, вызывающие снижение активности BuChE на 20 и 50% соответственно. Для повышения чувствительности препаратов к действию ФОС была введена процедура предварительной инкубации препарата в исследуемом растворе ингибирующего вещества в течение 5 мин.

Мы обнаружили, что препараты на основе крахмального геля обладали высокой чувствительностью к действию ФОС. Значение IC_{50} для малатиона составило 0,008 мг/л, что ниже уровня ПДК в 6 раз (рис. 3а). Внесение пиримифосметила также

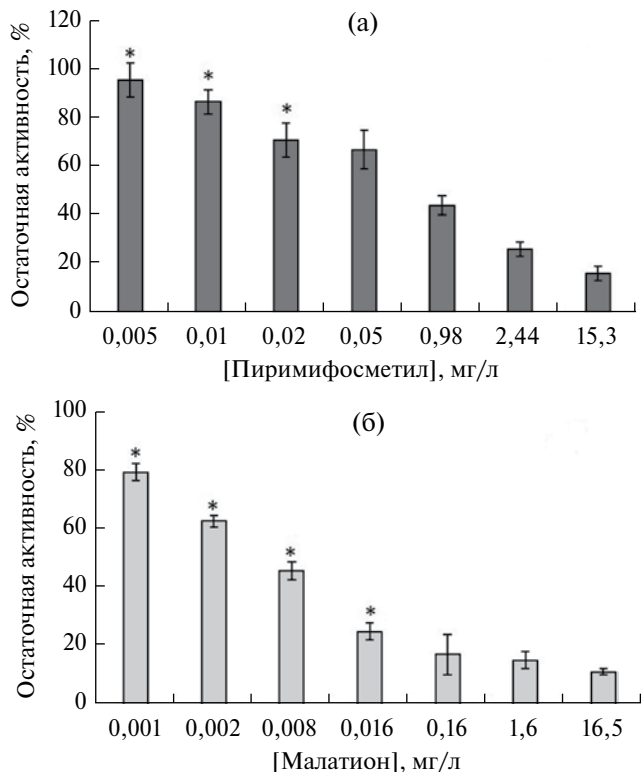


Рис. 3. Зависимость остаточной активности препаратов BuChE, иммобилизованной совместно с реагентом Элмана в крахмальный гель, в присутствии ингибирующих веществ: пиримифосметила (а) и малатиона (б), $M \pm m$, $n = 5$, $*p < 0,05$. Концентрации ингибитора ниже по сравнению с ПДК.

снизило активность иммобилизованной BuChE (рис. 3б). Однако в данном случае близким к значению ПДК для данного вещества (0,01 мг/л) было значение параметра IC_{20} (0,015 мг/л). Для препаратов на основе желатинового геля характерна низкая чувствительность к действию малатиона и пиримифосметила. Это может быть связано с высокой степенью стабилизации фермента данным носителем.

Таким образом, в настоящей работе представлен метод получения стабильных при хранении препаратов бутирилхолинэстеразы путём включения фермента в природные полимерные гели с последующим высушиванием. Дополнительное внесение в состав реактива Элмана позволяет упростить процедуру и сократить время анализа. Ферментные препараты на основе крахмального геля обладают высокой чувствительностью к действию фосфорорганических соединений. Поэтому, с точки зрения практического использования разработанных иммобилизованных препаратов для аналитического контроля содержания ФОС в разных образцах, крахмал является наиболее подходящим носителем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке совместного гранта Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности № 16–44–242126, а также при частичном финансировании за счёт средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 01201351504).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Luque de Castro M.D., Herrera M.C.* // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 18. P. 279–294.
2. *Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G.* // Biosens. Bioelectron. 2006. V. 21. P. 1405–1423.
3. *Davis F., Law K.A., Chaniotakis N.A., Fournier D., Gibson T., Millner P., Marty J.-L., Sheehan M.A., Ogurtsov V.I., Johnson G., Griffiths J., Turner A.P.F., Higson S.P.J.* // Comprehensive Anal. Chem. 2007. V. 49. P. 311–330.
4. *Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А.* // Изв. АН. Сер. хим., 2007. № 7. С. 583–597.
5. *Евтюгин Г.А.* Проблемы аналитической химии. Отделение химии и наук о материалах РАН. Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. Т. 12. 391 с.
6. *Ellman G.L.* // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. P. 88–95.
7. *Andreescu S., Marty J.-L.* // Biomol. Eng. 2006. № 23. P. 1–15.
8. *Ильичева Н.Ю., Бейлинсон Р.М., Медянцева Э.П., Будников Г.К., Ванягина О.Н.* // Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 6. С. 409–412.
9. *Wan K., Chivelon J.M., Jaffrezic-Renault N.* // Talanta. 2000. V. 52. P. 663–670.
10. *Glenn R.J., Luckarift H.R.* Enzyme Stabilization and Immobilization. Enzyme Stabilization via Bio-Templated Silicification Reactions. 2017. 231 p.
11. *Есимбекова Е.Н., Лонишаква-Мукина В.И., Безруких А.Е., Кратасюк В.А.* // ДАН. 2015. Т. 461. № 4. С. 473–475.
12. *Bezrukikh A., Esimbekova E., Nemtseva E., Kratasyuk V., Shimomura O.* // Anal. and Bioanal. Chem. 2014. V. 406. Iss. 23. P. 5743–5747.
13. *Есимбекова Е.Н., Лонишаква-Мукина В.И., Кратасюк В.А.* Пат. РФ № 2546245. // Бюл. Изобретения. Полез. Модели 2015. № 10. 2015.